



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

CARTA PATENTE Nº PI 8404421-7 *Privilégio de Invenção*

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL,  
para garantia da propriedade e do uso exclusivo do privilégio, na forma dos anexos, expede, nos  
termos da legislação em vigor, ressalvados os direitos de terceiros e a responsabilidade do Governo  
quanto à novidade e à utilidade, a presente patente, mediante as características e condições abaixo:

(21) Número do Depósito: *PI8404421.*

(22) Data do depósito: *04/09/84.*

(51) Classificação Internacional: *C12N 11/08*

(30) Prioridade Unionista: *05/09/83 DK 4025/83.*

(54) Título: *Processo para a produção de uma preparação de lipase imobilizada, destinada a  
interesterificação de gorduras.*

(73) Titular: *Novo Nordisk A/S. Sociedade Dinamarquesa. Endereço: Novo Allé, DK-28880  
Bagsvaerd, Dinamarca (DK).*

(72) Inventor: *Peter Eigved. Engenheiro. Endereço: Parcelvej 42 A, Holte 2840, Dinamarca.  
Cidadania: Dinamarquês.*

Prazo de validade : *15 (quinze) anos contados a partir de 04/09/84, observadas as  
condições legais.*

Expedida em: *25 de Abril de 1995.*

*Maria Margarida R. Mittelbach*  
Diretora de Patentes

*Manoel Ramos da Silva*  
Chefe da Seção de Apoio Técnico.



BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0034000

Relatório Descritivo da Patente de Invenção "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PREPARAÇÃO DE LIPASE IMOBILIZADA, DESTINADA À INTERESTERIFICAÇÃO DE GORDURAS".

5 Conhecem-se as preparações de lipase immobilizada para transesterificação de gordu  
ras. Assim, no pedido de patente DK nº 563/77, (corres  
pondendo à patente US 4.275.081) descreve-se a prepa  
ração de lipase immobilizada, por meio do que se produz  
10 a lipase por fermentação de espécies pertencendo ao  
gênero Rhizopus, Geotrichum ou Aspergillus, e por meio  
do que a lipase é fixada em um veículo em partículas  
indiferente, que pode ser terra diatomácea ou alumina,  
e que demonstra uma área superficial específica muito  
15 elevada. Demonstrou-se ser necessário o uso de uma  
preparação de lipase immobilizada com uma área super  
ficial específica muito elevada (isto é, partículas  
de veículo porosas e pequenas) a fim de obter a  
necessária elevada atividade enzimática. Pode-se  
20 realizar a interesterificação em batelada sem um  
solvente com esta preparação de lipase immobilizada;

no entanto, com esta preparação de lipase imobilizada, não se pode realizar a interesterificação contínua, em uma coluna, em escala industrial sem a presença de um solvente, que precisa ser depois removido, devido ao fato acima indicado de que a preparação consiste de pequenas partículas que, durante a operação da coluna, iriam gerar uma queda de pressão inaceitavelmente elevada. Também, um painel apresentado em Enz. Eng. 6, Kashikojima, JP, 20-25 de setembro de 1981, e o artigo do European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, nº 14, pags. 1-5, (1982) indicam que uma preparação de lipase imobilizada compreendendo lipase de *Rhizopus delemar* e uma resina trocadora de anions forte (com grupos amino quaternários) pode ser usada para interesterificação com n-hexano como um solvente. De acordo com estas referências, a recuperação da enzima é muito lenta. Também, a partir do pedido de patente europeia publicada com a publicação nº 00669599, descreve-se um re-arranjo enzimático de gordura, por meio do que se usa uma lipase das espécies *Aspergillus*, espécies *Rhizopus*, *Mucor javanicus* ou *Mucor miehei*, como uma enzima de interesterificação. A enzima é suportada em um veículo, por exemplo Celite. Em todos os exemplos deste pedido de patente europeia com relação à in-

teresterificação contínua em uma coluna, usa-se um solvente.

Assim, nos processos da técnica anterior, usa-se o solvente para diminuir a viscosidade da matéria-prima graxa a fim de obter uma operação na coluna tão suave quanto possível. Pareceu até agora praticamente impossível evitar solvente nestes processos de interesterificação contínuos em uma escala industrial, devido à elevada queda de pressão na coluna, mesmo sendo bastante óbvias as vantagens técnicas associadas com a eliminação de solvente destes processos de interesterificação.

No pedido de patente européia publicado como nº 35.883, descreve-se que uma preparação de lipase imobilizada destinada à interesterificação de gorduras pode ser preparada por contato de uma solução aquosa de lipase microbiana com um veículo inerte em partículas, seguido por secagem. Pode-se usar a preparação de lipase imobilizada, assim preparada, para interesterificação de gordura, mas somente se as gorduras forem misturadas com os ésteres de alquila inferiores, relativamente onerosos, de ácidos graxos, por exemplo, palmitato de metila, que são usados como agentes auxiliares a fim de evitar solventes; de outra for

ma, surgem os problemas de solubilidade e viscosidade.

Assim, a finalidade da invenção é prover um processo para a produção de uma preparação de lipase imobilizada, que irá abrir a possibilidade de realizar a interesterificação contínua sem um solvente ou outros agentes auxiliares onerosos em um modo economicamente viável.

Agora, verificou-se, de modo surpreendente de acordo com a invenção, que um processo para a produção de uma preparação de lipase imobilizada, que é realizado de modo muito fácil, ou seja, por simples misturação de uma solução aquosa de lipase e uma resina trocadora de ions e que compreende uma combinação específica de uma categoria específica de resinas trocadoras de ions e uma proporção específica de água na preparação de lipase imobilizada final abre a possibilidade de realizar a interesterificação contínua sem um solvente ou outros agentes auxiliares onerosos em um modo economicamente viável.

Assim, o processo de acordo com a invenção para a produção de uma preparação de lipase imobilizada destinada à interesterificação de gorduras é caracterizado pelo fato de que a solução aquosa de uma lipase microbiana é con-

tata com uma resina trocadora de anions, fraca, macroporosa, em partículas, que contém grupos amino primários e/ou secundários, e/ou terciários, e que demonstra um tamanho de partícula média relativamente grande, apropriado para operação em coluna sem queda de pressão excessiva, em condições em que a lipase é ligada à resina trocadora de anions durante um período de tempo suficiente para ligar a quantidade desejada de lipase à resina trocadora de anions, a seguir a lipase imobilizada, assim formada, é separada da fase aquosa e a lipase imobilizada separada é secada a um teor em água de entre aproximadamente 2 e 40%.

Descreve-se, em geral, nos pedidos de patente publicados DE nºs 2.905.671 e 2.805.950, pedidos de patente publicados JP nºs 54-76892 e 57-152886, patente US nº 4.170.696 e Chem. Abs. Vol. 82, 27819d, que as enzimas, incluindo lipases, podem ser imobilizadas por meio de resinas trocadoras de anions em partículas. Em primeiro lugar, no entanto, não existe nenhum processo de imobilização universal apropriado para todas as enzimas e todos os substratos, mas um processo de imobilização específico precisa ser projetado para qualquer enzima específica e qualquer substrato específico, em que se supõe atua a enzima. Em

segundo lugar, no entanto, as lipases são enzimas bastante extraordinárias, no sentido que a atividade enzimática está funcionando em uma interfase entre duas fases, significando que a imobilização das lipases é um problema muito delicado, que limita altamente a utilidade de técnicas de imobilização conhecidas no campo, compreendendo imobilização de lipase, vide J.Lavayre et al. , Preparation and Properties of immobilized Lipases, Biotechnology and Bio engineering, vol. XXIV, pp 1007 - 1013(1982), John Wiley & Sons. Em terceiro lugar, a combinação de lipase e uma resina trocadora de anions fraca, macroporosa, em partículas, não é descrita em nenhuma parte da literatura indicada no começo deste parágrafo, ainda menos que esta nova combinação dá lugar ao surpreendente efeito técnico com relação à interesterificação contínua sem solvente ou outros agentes auxiliares onerosos.

Também, a partir de um artigo de Yoshiharu Kimura et al., "Application of Immobilized Lipase to Hydrolysis of Triacylglyceride", no Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1983) 17-107-112, parece que se usou uma preparação de lipase imobilizada em uma resina trocadora de anions, para hidrólise de gorduras. Em primeiro lugar, a principal aplicação da preparação de lipa-

se imobilizada, produzida por meio do processo de acordo com a invenção, é a interesterificação, enquanto que a hidrólise de gorduras e síntese de gorduras são aplicações menos importantes de acordo com a invenção, que serão explicadas em maiores detalhes abaixo no relatório, e em segundo lugar, nota-se, a partir do artigo, que o rendimento da atividade é inferior a 1%, ver tabela 1, pág. 109, em comparação com um rendimento da atividade tipicamente acima de 80% com relação à preparação de lipase imobilizada preparada por meio do processo de acordo com a invenção. Isto confirma nossa afirmação anterior de que a imobilização de lipase é um problema muito delicado.

Pretende-se que a expressão "tamanho de partícula médio relativamente grande" esteja relacionada com o tamanho de partícula médio do produto, que se descreve no pedido de patente DK nº 563/77, do qual a maior parte das partículas tem um tamanho de partícula menor que aproximadamente 50  $\mu$ m. Verificou-se que a temperatura não tem maior efeito sobre o rendimento da atividade, porque se demonstrou experimentalmente que o rendimento da atividade é virtualmente independente da temperatura, no caso da temperatura durante a imobilização ser mantida entre 5 e 25°C.

A fim de não desativar a enzima,



realizam-se as interesterificações da técnica anterior em temperatura relativamente baixa. Isto se torna possível pela presença do solvente, que consegue dissolver a gordura, que pode ter um ponto de derretimento relativamente elevado. De modo surpreendente, verificou-se que a preparação de lipase imobilizada, produzida por meio do processo de acordo com a invenção, tem uma estabilidade suficiente na gordura derretida, com uma temperatura relativamente maior. Também, a queda de pressão através da coluna de interesterificação carregada com a preparação de lipase imobilizada, produzida por meio do processo de acordo com a invenção, é suficientemente baixa para permitir uma operação suave. Também, verificou-se, de forma surpreendente, que a combinação singular das condições de contato, resina trocadora de ions e teor em água, gera uma atividade de lipase específica elevada, na mistura de gordura derretida, em contra-distinção com todas as tentativas anteriores de prover uma preparação de lipase imobilizada destinada ao uso sem um solvente. Além disso, enquanto os processos da técnica anterior do tipo descrito no pedido de patente DK nº 563/77 requerem uma lipase purificada a fim de prover uma preparação imobilizada utilizável, verificou-se de forma surpreendente

que a preparação de lipase imobilizada de acordo com a invenção pode ser preparada com base em um produto de lipase bastante bruto. Também, apesar da preparação dos processos da técnica anterior

5 do tipo descrito no pedido de patente DK nº 563/77 ter envolvido o uso de um solvente orgânico para depositar a lipase sobre o veículo, não se necessita deste solvente orgânico para a preparação da

10 preparação de lipase imobilizada de acordo com a invenção, que pode ser preparada de modo bastante fácil apenas misturando o veículo e uma solução lipase aquosa. Além disso, enquanto a atividade da lipase é lavada com relativa facilidade ou de outra forma removida da preparação da técnica anteri-

15 or do tipo descrito no pedido de patente DK nº 563/77, verificou-se que a lipase na preparação de lipase imobilizada, produzida por meio do processo de acordo com a invenção, é praticamente impossível de remover da preparação, se não for

20 submetida a tratamentos químicos ou físicos adversos, por exemplo condições de pH e temperaturas adversas. Por fim, verificou-se que a preparação de lipase imobilizada, produzida por meio do processo de acordo com a invenção, pode ser preparada com uma elevada recuperação da enzima, possibilitando uma interesterificação contínua mais barata do que as interesterificações da técnica ante-

rior.

Em uma forma de realização preferida do processo de acordo com a invenção, a lipase é uma lipase termoestável. Assim, é possível uma maior temperatura de interesterificação, e assim uma maior produtividade. Além disso, por meio desta forma de realização, é possível produzir uma preparação de lipase imobilizada que é apropriada para interesterificação de gorduras de maior ponto de derretimento.

Em uma forma de realização preferida do processo de acordo com a invenção, a lipase microbiana é derivada de uma espécie *Mucor termofílica*, especialmente *Mucor Miehei* é um bom produtor de lipase, 1,3-específica, e assim pode-se obter um produto barato.

Em uma forma de realização preferida do processo de acordo com a invenção, acima de 90% das partículas da resina trocadora de anions fraca, macroporosa, tem um tamanho de partícula entre aproximadamente 100 e 1.000  $\mu\text{m}$ , de preferência entre 200 e 400  $\mu\text{m}$ . Neste intervalo de tamanho de partícula, obtém-se um bom ajuste entre elevada atividade de interesterificação e baixa queda de pressão.

Em uma forma de realização pre-

ferida do processo de acordo com a invenção, a proporção entre a quantidade de solução aquosa da lipase microbiana e o peso da resina trocadora de anions fraca corresponde a 5.000 - 50.000 LU/g de resina trocadora de ions (peso no estado seco). Deste modo, provê-se uma lipase suficiente para a resina trocadora de ions.

Em uma forma de realização preferida do processo de acordo com a invenção, a lipase microbiana é derivada de uma espécie *Mucor termofílica*, especialmente *Mucro miehei*, e o pH durante o contato entre a resina trocadora de ion e a solução aquosa está entre 5 e 7. Deste modo, assegura-se uma forte ligação entre a lipase a resina trocadora de ions, assim como boas estabilidade e atividade.

Em uma forma de realização preferida do processo de acordo com a invenção, o tempo de contato está entre 0,5 e 8 horas. Deste modo, obtém-se ou se aproxima de um estado de saturação com lipase.

Em uma forma de realização preferida do processo de acordo com a invenção, a separação é feita por simples filtragem. Este processo é simples e bem adaptável à prática industrial.

Em uma forma de realização preferida do processo de acordo com a invenção, a secagem é realizada a um teor em água entre aproximadamente 5 e 20% de água. Pode-se realizar a operação de secagem em vácuo, em leito fluído ou por outro dispositivo de secagem apropriado para operação em grande escala. Assim, obtém-se uma preparação de lipase final com uma elevada atividade de interesterificação.

Em uma forma de realização preferida do processo de acordo com a invenção, a resina trocadora de anions, fraca, macroporosa, em partículas, é colocada junto com uma solução aquosa de um agente de reticulação, de preferência uma solução de glutaraldeído aquosa, em uma concentração entre 0,1 e 1,0% p/p, durante ou após o contato entre a resina trocadora de anions, fraca, macroporosa, em partículas, e a solução aquosa da lipase microbinada, depois do que se separa a solução restante de agente de reticulação. Mesmo se se observar uma pequena redução de atividade da enzima devido ao agente de reticulação, observou-se que este tratamento pode elevar a estabilidade da preparação da lipase em meio aquoso para uma aplicação específica. Com relação ao uso da preparação de lipase imobilizada como um agente de interesterifi-

cação, não há necessidade de nenhuma melhora na estabilidade da preparação da lipase, porque esta estabilidade é inerentemente excelente na preparação de lipase, preparada de acordo com a invenção para esta aplicação. No entanto, verificou-se que a preparação de lipase imobilizada, preparada de acordo com o processo de acordo com a invenção, pode ser usada ainda com vantagem, para hidrólise de gorduras e para esta aplicação, uma melhora da estabilidade da preparação de lipase é um desiderato, provavelmente devido à combinação de concentração relativamente elevada de água e elevadas temperaturas na mistura de reação, necessárias para um processo de hidrólise de gordura, realizado na indústria.

Também, a invenção compreende um uso da preparação de lipase imobilizada, preparada por meio do processo de acordo com a invenção, que é um processo para a interesterificação de gorduras, em que a(s) gordura(s) derretida(s), facultativamente misturada(s) com ácido graxo livre dissolvido, é (são) contactada(s) pela preparação de lipase imobilizada, preparada por meio do processo de acordo com a invenção, sem qualquer solvente ou outros agentes auxiliares onerosos ou substancialmente sem qualquer solvente ou outros agentes auxiliares onerosos. Os

ácidos graxos livres, com os quais as gorduras podem ser misturadas facultativamente de acordo com a invenção, não são considerados como agentes auxiliares onerosos. Gordura(s) designa(m) ou um triglicerídeo puro ou uma mistura de triglicerídeos de uma ou mais fontes.

Também, a invenção compreende outro uso da preparação da lipase imobilizada, preparada por meio do processo de acordo com a invenção, que é um processo para a hidrólise de gorduras, em que uma emulsão de triglicerídeo e água é contatada com a preparação de lipase imobilizada produzida de acordo com a invenção, sem qualquer solvente ou outros agentes auxiliares onerosos, ou substancialmente sem quaisquer solventes ou outros agentes auxiliares onerosos.

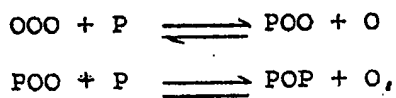
Também, a invenção compreende outro uso da preparação de lipase imobilizada, preparada por meio do processo de acordo com a invenção, que é um processo para a síntese de gorduras, em que uma mistura de glicerol e ácidos graxos livres é contatada com a preparação de lipase imobilizada produzida de acordo com a invenção, sem qualquer solvente ou outros agentes auxiliares onerosos, ou substancialmente sem quaisquer solventes ou outros agentes auxiliares onerosos.

A invenção será ilustrada pelos seguintes

Exemplos.

Pode-se adquirir a lipase Mucor miehei, usada nos seguintes exemplos, na NOVO Industri A/S, Novo Alle, 2880, Bagsvaerd, Dinamarca.

A atividade de interesterificação das preparações de lipase imobilizada é determinada por meio de um ensaio em batelada sobre as seguintes reações:



em que

O = ácido oleico,

P = ácido palmítico, e

OOO, POO e POP são gorduras contendo os ácidos graxos indicados na ordem indicada, assim como

OOO sendotrioleína.

Mistura-se 250 mg de preparação de lipase imobilizada com 600 mg de trioleína (0,68 mmol) e 174 mg de ácido palmítico (0,68 mmol) dissolvido em 12 ml de álcool de petróleo (temp. 80 - 100°C), em um tubo de vidro de 20 ml, com tampa de rosca. Os tubos são incubados em um banho em água a 40°C e agitados por 1/2, 1 ou 3 horas.

A mistura de reação é resfriada, filtrada e evaporada. A quantidade relativa de



OOO, POO e POP é determinada por HPLC, e a porcentagem de P incorporado é calculada como

$$\% \text{ P incorporado} = \frac{\% \text{ POO} + 2 \times \% \text{ POP}}{3}$$

A composição de equilíbrio da mistura de reação em batelada acima indicada é de aproximadamente 43% PO e 10% POP ou 21% P incorporado.

Em alguns dos seguintes exemplos, realiza-se a interesterificação como uma operação em batelada, com ou sem solvente. Por testes comparativos, estabeleceu-se que uma preparação de lipase imobilizada, que tem estabilidade e atividade de interesterificação satisfatória, como demonstrado pelo teste de interesterificação em batelada, e que possui uma distribuição de tamanho de partícula e uma resistência física requerida para operação satisfatória na coluna, irá operar satisfatoriamente por operação contínua em coluna, tão bem com ou sem solvente. Assim, um teste em batelada satisfatório, sob estas circunstâncias, é uma evidência de que se pode realizar um teste em coluna contínuo, satisfatório, com a preparação de lipase imobilizada em questão.

#### EXEMPLO 1

Este exemplo ilustra o efeito de

pH durante a adsorção de lipase *Mucor miehei* sobre a atividade da interesterificação.

Dissolve-se , 2,0 gramas de lipase *Mucor miehei*, 93 000 LU/g , em 20 ml de água, e 10 gramas de resina trocadora de anions, Duolite ES 562, lavada com água, peso no estado seco 8,5 g, aí suspensas.

Ajustaram-se tres destas porções a pH 5,0, 6,0, e 7,0, respectivamente, e deixaram-se as mesmas agitadas com agitação magnética, por 4 horas, a aproximadamente 5°C.

Filtraram-se as tres porções. Após filtração, a quantidade de atividade hidrolítica (LU) nos tres filtrados (antes lavagem, estava entre 10 e 17% do total, quantidades iniciais (186.000 LU). Subsequentemente, realizou-se uma lavagem com água com uma pequena quantidade de água e, a seguir, secaram-se pela noite as preparações em vácuo, em temperatura ambiente.

Resumem-se os resultados na tabela abaixo.

Imobi- liza- ção	Ren - dimen- to	Teor em água	Atividade de interes- terificação, 30 mi- nutos		
			% POO	% POP	%P in- corporado
pH	g	%			
5,0	9,20	9,5	24,5	6,2	12,3
6,0	9,56	8,2	26,5	6,6	13,2
7,0	9,41	8,0	21,2	5,2	10,2

### EXEMPLO 2

Tres porções de 10g de resina trocadora de ion, úmida, Duolite ES 562, (peso no estado seco 8,35 g), em 50 ml de água, e adicionou-se 4 N NaOH, até o pH estabilizar a 6,0. Então, lavaram-se com bastante água, e drenou-se em um funil Buchner, peso drenado de aproximadamente 16 g.

Adicionou-se, a cada uma das duas porções de 10 g, uma solução de 2,5 g de lipase *Mucor miehei* (atividade 93 000 LU/g), em 25 ml de água, e amustou-se o pH a 6,0.

Adicionou-se, à terceira porção, uma solução de 2,5 g da lipase *Mucor miehei*, acima indicada, em 50 ml de água, e ajustou-se o pH a 6,0.

Agitou-se lentamente a mistura a temperatura ambiente (25°) por 2 horas. A seguir, filtrou-se o líquido em um funil Buchner.

Uma das porções, com solução de 25 ml de lipase, foi ainda lavada com 2 x 25 ml de água. As preparações imobilizadas foram secadas em vácuo.

Para o ensaio de interesterificação, 250 mg (peso no estado seco) das preparações de lipase imobilizada foram umedecidos com 20  $\mu$ l de água, antes da misturação com o substrato.

Preparação lipase imobilizada com	Interesterificação, 1/2 h		
	%POO	%POP	%P incorporado
2,5 g lipase em 25 ml sem lavagem .....	25,8	6,85	13,2
2,5 g lipase em 25 ml com lavagem .....	30,1	7,65	15,1
2,5 g lipase em 50 ml sem lavagem .....	26,8	6,86	13,5

Este exemplo demonstra que a subsequente lavagem em água, a fim de remover a lipase não ligada, é essencial para obter uma elevada atividade de interesterificação, enquanto a quantidade de água, em que a lipase é dissolvida durante a imobilizada, não tem grande importância.

### EXEMPLO 3

Ajustou-se 50 g de resina trocadora de ions, úmida, Duolite ES 562 (peso no estado

seco 41,8 g), a pH 6,0 , e lavou-se como no exemplo 2.

Misturou-se porções de 10,6 g desta resina trocadora de ions úmida ( ~5g peso no estado seco) com quantidades diferentes de uma solução a 10% de lipase Mucor miehei (81 000 IU/g), de acordo com a tabela.

Após a reação, o líquido foi filtrado em um funil Buchner, a preparação lipase lavada com 2 x 25 ml de água e secada em vácuo a aproximadamente 97% de matéria no estado seco.

As amostras de 25 mg de peso no estado seco de preparação imobilizada para fins de ensaio foram umedecidas com 20  $\mu$ l de água antes da amostragem.

g de resina trocadora de ions úmida	g de solu- ção a 10% de lipase	Tempo reação horas em temper. ambiente	Interesterifica- ção, 1/2 h		
			% POO	%POP	%P in corpo rado
10,6	12,5	1	26,5	6,62	13,3
5 10,6	12,5	2	27,0	6,62	13,4
10,6	12,5	4	28,2	7,27	14,3
10,6	25	1	23,5	5,90	11,8
10,6	25	2	29,7	7,56	14,9
10,6	25	4	31,4	7,99	15,8
10 10,6	50	1	19,5	4,34	9,4
10,6	50	4	26,6	6,73	13,4

Este exemplo mostra que a dosagem  
ótima de lipase depende do tempo de reação.

#### 15 EXEMPLO 4

Amostraram-se novamente duas das  
preparações do exemplo 3 com variada adição de á-  
gua, isto é, a amostra com 12,5 g de solução li-  
pase e a com 25 g de solução lipase, ambas com um  
20 tempo de reação de 2 horas. O efeito do teor em  
umidade sobre a atividade de interesterificação é  
evidente na seguinte tabela.

Amostra	ml água adiciona- da 250mg peso seco	umidade estima- da na a mostra,	Interesterificação, 1/2 hora		
			% POO	%POP	%P in- corporada
12,5 g	0	2,6	18,2	2,27	7,6
	20	9,6	25,6	6,55	12,9
	50	18,5	23,4	5,85	11,7
	100	29,9	15,3	3,84	7,6
25 g	0	3,0	19,1	2,04	7,7
	20	10,0	28,6	7,65	14,6
	50	18,8	25,4	5,25	12,0
	100	30,1	18,6	4,55	9,2

Este exemplo mostra que o teor em umidade ótimo é de aproximadamente 10%.

#### EXEMPLO 5

Amostrou-se novamente uma das preparações do exemplo 3 com variadas quantidades de água adicionada. Usou-se a amostra com 25g de solução lipase e 4 horas de tempo de reação.

	µl água adic cionada a 233 mg peso seco	água esti mada na amostra, %	Interesterificação, 1/2h		
			%POO	%POP	% P in- corporado
	0	9,5	28,0	6,57	13,7
5	10	13,1	28,9	7,45	14,6
	20	16,2	27,9	6,46	13,6
	30	19,1	26,6	6,96	13,5
	40	21,8	25,0	6,77	12,8
	50	24,4	22,8	5,20	11,1
10	75	30,0	19,6	4,54	9,6
	100	34,9	14,6	3,88	7,5
	150	42,9	0,44	0	0,1

#### EXEMPLO 6

15 Ajustou-se , a pH 6,0 e lavou-se  
22,6g de resina trocadora de ions úmida, Duolite  
A 561 (88,2% de substância seca).

Triturou-se outra amostra de 22,8g  
de Duolite A 561 parcialmente em uma argamassa, an-  
20 tes do ajuste do pH e lavagem.

Adicionou-se, a cada uma destas  
porções, uma solução de 10g de lipase Mucor miehei  
(93.000 LU/g) em 200 g de água ajustada a pH 6. A  
reação ocorreu em 2 horas em temperatura ambiente.

25 As enzimas imobilizadas foram la-  
vadas com 1 litro de água e secadas em vácuo.



Após secagem, a amostra não triturada foi esmagada em uma argamassa e ambas amostras peneiradas.

Fração peneira	Interesterificação, 1/2 h					
	Trituração antes imobilização			Trituração após imobilização		
	%POO	%POP	%P in corp.	%POO	%POP	%P in corp.
180-300 $\mu$ m	30,1	7,78	15,2	25,7	6,39	12,8
425-500 $\mu$ m	25,7	6,66	13,0	21,7	5,50	10,9
600-710 $\mu$ m	19,2	5,06	9,8	17,2	4,38	8,7
850-1000 $\mu$ m	12,7	3,22	6,4	14,3	3,90	7,4

Nota-se nitidamente que é uma vantagem usar as frações de peneira finas para obter uma atividade máxima de interesterificação, mas a necessidade de uma baixa queda de pressão na coluna torna necessário um ajuste.

#### EXEMPLO 7

Este exemplo ilustra o efeito de diferentes categorias de resinas trocadoras de anion, fracas, macroporosas (tipo de matriz, grupos funcionais tamanho de partícula) sobre a atividade da interesterificação em batelada da preparação de lipase imobilizada.

Nos casos de Duolite ES 562, Duolite A 561, Duolite A 7, Amberlite IRA 93, e

Amberlyst A 21, 4,25 gramas de resina com peso no estado seco, são lavados com água, misturados com 1 grama de lipase *Mucor miehei* (93 000 LU/g) em 20 ml de água, sendo a mistura ajustada a pH 6,0, e lentamente girada por 2 horas em temperatura ambiente. Após filtração, cada preparação é lavada com 250 ml de água. No caso de Duolite A, 378, 8,5 grmas foram misturados com 2 gramas de lipase e finalmente lavados com 250 ml de água. Secou-se tudo em vácuo, em temperatura ambiente. No caso de Duolite A 365, Duolite S 587, e Dowex MWA-1, 4,25 gramas de resina seca foram misturados com 1 grama de lipase *Mucor miehei* (124 000 LU/g), em aproximadamente 10 ml de água por 2 horas, por rotação em temperatura ambiente (no caso de Lewatit, 0,5 g de lipase foram usados). Após filtração e lavagem com 2 volumes de água, as preparações foram secas em vácuo em temperatura ambiente. Apresenta-se, na tabela abaixo, a caracterização das preparações 20 immobilizadas.

Resina trocadora de anions	Matriz	Grupos func.	Tam. part. / $\mu$ m (>85%)	Água Ativ. batelada, 1/2 h			
				%	%POO	%POP	%P incororado
Duolite ES 562	Fenolfor maldeído	Amina terc.	212-425	13,8	26,7	6,8	13,4
Duolite A 561	Fenolfor maldeído	Amina terc.	300-1200	13,0	14,8	3,2	7,1
Duolite A 7	Fenolfor maldeído	Amina sec.	300-1200	13,5	9,5	2,5	4,8
Duolite A 378	Poliesti rênico	Amina terc.	300-1100	6,3*	14,3	3,3	7,0
Amberlite IRA 93	Estireno DVB	Poli-amina	400-500	12,2	10,8	2,9	5,5
Amberlite A 21	Estireno DVB	Amina terc.	425-850	11,1	10,6	2,7	5,3
Duolite A 365	Poliesti rênico	Amina Prim.	300-1200	11,5	15,5	3,7	7,6
Duolite S 587	Fenolform.	Aminas	300-1100	7,4	25,4	6,4	12,7
Lewatit MP 62	Polies-tirenico	Aminas	300-1200	13,6	16,9	3,9	8,2
BOWEX MWA-1	Estireno DVB	Amina terc.	300-1200	10,5	21,0	4,9	10,3

5% água adicionados ante ensaio em batelada

#### EXEMPLO 8

Colocou-se em suspensão 30g de resina trocadora de ions Duolite tipo ES 562, em aproximadamente 75 ml de H<sub>2</sub>O, e ajustou-se o pH a 6,0 com

4 N NaOH. Lavou-se a resina trocadora de ions com água em um filtro de sucção, e sugou-se a água em excesso. Dividiu-se a resina trocadora de ions úmida (aproximadamente 45 g) em tres porções iguais.

Misturou-se o primeiro terço com uma solução de 1 g de lipase Mucro miehei (210 000 LU/g) em 20 ml de H<sub>2</sub>O, ajustados a pH 6,0. Após misturação, reajustou-se o pH a 6,0, e deixou-se a mistura reagir por 4 horas, a 5°C, com agitação magnética. Durante este período o pH caiu a 5,45. A mistura foi transformada em um funil Buchner, com alguns mililitros de água, e sugou-se quanto possível da solução (14 ml). Secou-se mais a resina em vácuo, a um teor em água de 10,0%. Rendimento 8,27 g.

Misturou-se o segundo terço da resina úmida com uma solução de 1 g de lipase previamente indicada, em 20 ml de tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 6,0). Reajustou-se o pH da mistura a 6, e deixou-se a mistura reagir por 4 horas a 5°C, com agitação magnética. Durante este período, o pH caiu a 5,83. Realizou-se outro procedimento como indicado com relação ao primeiro terço da resina trocadora de ions no estado úmido, dando lugar a 21 ml de filtrado e 9,10 de preparação seca,

com um teor em umidade de 9,5%.

Misturou-se o terceiro terço da resina com solução lipase, como anteriormente, mas se manteve o pH constante a 6,0, durante o período de copulação de 4 horas, a 5°C, por adição de 0,58 ml de NaOH 1 N. Trabalhou-se a mistura com os outros terços, dando lugar a 28 ml de filtrado e 8,95 g de preparação seca, com 8,9% de umidade. Os tres filtrados continham entre 1 e 5% de atividade inicial, total.

Indica-se, na seguinte tabela, a atividade de interesterificação com 250 mg de preparação de lipase imobilizada após um tempo de reação de 30 minutos, a 40°C.

Preparação enzima imobilizada em	Interesterificação 1/2 h % POO	atividade %POP	%P incorporado
água desmineralizada, pH 6	27,4	6,6	13,5
0,1 M acetato, pH 6	25,4	6,5	12,8
água desmineralizada, pH-stat a pH 6	27,7	7,0	13,9

Como é evidente a partir da tabela existem apenas leves diferenças entre as preparações.

EXEMPLO 9

Este exemplo ilustra os efeitos da presença de dois sais na faixa de concentração 0-0,5 M, durante imobilização sobre a atividade de interesterificação.

Dissolveram-se cinco porções de 1,00 gramas de lipase *Mucor miehei*, diafiltrada, e secadas -congeladas, com uma atividade de 93.000 LU/g, em 20 ml de

- 1) água desmineralizada,
- 2) 0,05 M fosfato de sódio, pH 6,0
- 3) 0,5 M fosfato de sódio, pH 6,0
- 4) 0,05 M cloreto de sódio
- 5) 0,5 M cloreto de sódio.

Outras cinco porções de resina trocadora de ions 5,25 gramas (peso seco 4,25 g) de Duolite ES 562, foram equilibradas com 20 ml de 1) - 5) acima. Após decantação, as correspondentes soluções de lipase foram adicionadas às partículas de resina trocadora de ions, úmida, ajustada a pH 6,0, e os recipientes foram girados lentamente por 2 horas, a 25°C. Então, coletaram-se as preparações por filtração, e cada lavada com 250 ml de água desmineralizada, seguido por secagem em vácuo a 25°C (64 horas). Apresentam-se abaixo os resultados do ensaio da atividade de interesterifi-

cação:

Sal/ Concentra- ção	Rend. (g)	Atividade de Interesteri- ficação, 1/2 h			
		% H <sub>2</sub> O*	% POO	% POP	%P incorpor.
5. Sem sal	4,51	4,7	23,1	5,7	11,5
0,05 M fog fato	4,48	5,3	21,9	5,3	10,8
0,5 M -	4,57	4,6	20,3	5,1	10,2
0,05 M NaCl	4,54	4,6	23,4	5,7	11,6
10 0,5 M -	4,43	4,9	19,2	4,6	9,5

\* Adicionou-se, antes do ensaio, H<sub>2</sub>O adicional até um total de 10%.

#### E X E M P L O 10

Este exemplo mostra os efeitos das elevadas concentrações de acetato de sódio durante imobilização de lipase sobre a atividade de interesterificação das preparações.

Dissolveram-se, em separado, cinco porções de 1,00 g de lipase *Mucor miehei*, diafiltrou-se e secou-se, congelou-se as mesmas, 93 000 LU/g, em 20 ml dos seguintes líquidos:

- 1) água desmineralizada
- 2) 0,5 M acetato de sódio, pH 6,0
- 25 3) 1,0 M acetato de sódio, pH 6,0
- 4) 2,0 M acetato de sódio, pH 6,0
- 5) 4,0 M acetato de sódio, pH 6,0.

Cinco porções de 4,25 g (peso seco) de Duolite ES 562, resina trocadora de ions, foram lavadas e equilibradas por misturação com as cinco soluções acima indicadas 1) - 5), seguido por agitação por 15 minutos. As soluções de lipase correspondentes e resinas trocadoras de ions lavadas foram misturadas, ajustadas a pH 6,0, e giradas lentamente por 2 horas, em temperaturas ambiente. Cada preparação foi filtrada, lavada com 250 ml de água e secada em vácuo em temperatura ambiente. As preparações foram amostradas para atividades de interesterificação em batelada, sendo os resultados apresentados na seguinte tabela.

Conc. Aceta to (M)	Rend. após seca- gem (g)	Água após seca- gem (%)	Filtrado		Ativ. interesterificação em bat., 1/2 h		
			pH	Act. (%) *	%POO	%POP	%P incor porado
0	4,81	7,8	5,2	51	22,2	5,7	11,2
0,5	4,67	8,0	5,8	64	20,1	4,7	9,8
1,0	4,72	9,6	5,8	71	18,8	4,3	9,1
2,0	4,73	9,1	5,8	55	27,9	7,3	14,2
4,0	4,75	10,4	5,6	69	19,8	4,7	9,7

\* = Atividade em % da quantidade inicial total (93.000 LU)



EXEMPLO 11

Este exemplo ilustra a imobilização de outras lipases microbianas diferentes da lipase *Mucor miehei*:

Lipase *Fusarium oxysporum*, preparada como descrito no pedido de patente DK nº 2999/84, exemplo 23, foi imobilizada por misturação de 6,72 g de lipase de 88.000 LU/g, e 4,25 g de matéria seca de resina trocadora de ions Duolite ES 562, lavadas e o pH ajustado, em 25 ml de água a pH 6,0, e por rotação em temperatura ambiente por 2 horas. Então, realizou-se a lavagem com 2 x 25 ml de água, e secou-se por secagem a vácuo, obteve-se 4,93 g de preparação, com um teor em água de 8,1%. A atividade deixada no filtrado total correspondeu a 18% da atividade original.

Obteve-se esterase *Aspergillus niger* por ultrafiltração do produto comercial Palatase da NOVO. 15 ml de PALATASE de 2790 LU/ml foram imobilizados em 4,25 g de ES 562, como descrito acima, por meio do que se obteve 4,77 g de preparação imobilizada com 7,6 % de água. O filtrado continha 13% da atividade LU original.

Lipase *Candida cylindracea* de Amano (tipo OF) foi similarmente imobilizada por misturação de 4,25 g de ES 562 com 1,40 g lipase Amano OF

em 15 ml de água, pH 6,0. O rendimento foi de 4,62 de preparação imobilizada, com 6,5 % de água, e 0,2% de atividade permanecendo no filtrado.

As três preparações foram caracteri-

zadas como a seguir:

- 1) por ensaio em batelada padrão a 40°C
- 2) interesterificação em batelada de trioleína (OOO)/ácido decanóico (d) sem solvente, a 60°C, usando 3,00 g OOO, 0,600 g D, e 250 mg de preparação de lipase seca, hidratada a aproximadamente 10% de água.

Para fins de comparação, apresentam-se abaixo também os resultados para uma preparação de lipase *Mucor miehei*, como descrito no exemplo

13.

Lipase imobilizada	Carga aval. LU/mg	OOO/P/solvente, 40°C		OOO/D, 60°C	
		tempo, h	%P inc.	tempo, h	%D inc.
<i>Fusarium oxysporum</i>	11	3	8,0	17	5,9
<i>Aspergillus niger</i>	8	3	4,4	17	6,5
<i>Candida cylindracea</i>	30	3	8,9	17	1,9
<i>Mucor miehei</i>	30	0,5	14,7	2	13,2

A fim de gerar uma melhor verificação com relação aos exemplos precedentes, faz-se referência à seguinte tabela.

Este(s) exemplo(s) ilustra(m) a influência da atividade de interesterificação das preparações de lipase imobilizada preparadas por meio do processo de acordo com a invenção, se originando de:

## Exemplo

Nº	
1, 8	pH
2	lavagem subsequente
3	carga lipase com relação ao tempo de reação
4 - 5	porcentagem de água
6	tamanho de partícula
7	tipo de resina
8 - 10	resistência dos ions em solução de lipase
11	fonte de microorganismo de lipase

A fim de demonstrar a utilidade da preparação de lipase imobilizada, preparada por meio do processo de acordo com a invenção, uma preparação

de lipase imobilizada, preparada por meio do processo de acordo com a invenção, como indicado a seguir, foi usada em uma interesterificação contínua de gorduras, sem qualquer uso de solvente ou outros agentes auxiliares onerosos, como descrito no seguinte exemplo 12.

EXEMPLO 12

Este exemplo ilustra a interesterificação contínua de gorduras sem solvente ou outros agentes auxiliares onerosos, usando uma preparação de lipase imobilizada, preparada por meio do processo de acordo com a invenção em um reator de leito compactado.

IMOBILIZAÇÃO

Dissolveu-se 2,20 gramas de lipase *Mucor miehei* (81 000 LU/g) em 20 ml de água, misturou-se com 10 gramas de resina trocadora de ions Duolite ES 562 lavada (8,5 g de peso seco), com mais de 80% das partículas entre 200 e 400  $\mu\text{m}$ . Ajustou-se o pH da mistura a 5,0, e deixou-se por 4 horas a 5°C, com agitação magnética. Após filtração e lavagem com uma pequena quantidade de água, secou-se a preparação em vácuo em temperatura ambiente. O rendimento foi de 9,05 gramas, contendo 9,3% de água. A atividade restante no filtrado foi de 8% da quantidade inicial total. A atividade

de interesterificação em batelada foi de 30,6% POO, 7,7% POP em meia hora, ou 15,3% P incorporado.

#### TESTE EM COLUNA

Colocou-se 2 gramas desta preparação de lipase imobilizada em uma coluna e alimentou-se continuamente a 60°C, um substrato isento de solvente consistindo de óleo de oliva/ácido palmítico na relação de 2,5-1 p/p. Apresenta-se, na tabela abaixo, o desempenho da preparação de lipase.

Amostra/ tempo	Fluxo gTG/h/ g enz.	Composição(HPLC)			Conversão x, % (GLC)
		OOO %	POO %	POP %	
óleo oliva/ começo	-	42,3	22,5	3,8	0
17 h	5,7	30,5	30,1	11,6	-
208 1/2 h	2,5	33,8	28,8	8,6	28
233 -	0,61	22,2	34,8	16,5	67
475 -	1,8	35,1	28,8	8,7	28
Equilíbrio (batelada)	-	17,4	36,0	20,6	100

Legenda: TG - triglicerídeos; g enz. = gramas de lipase imobilizada,

Determina-se a % de P incorporado por GLC de ésteres de metila de ácido graxo.

Conversão  $x = (\%P - \%P_0) / (\%P_{eq} - \%P_0)$ .  $P_0$ ,  $P_{eq}$  são % de P incorporado no substrato de óleo de oliva ( $P_0$ ) e na mistura TG - em equilíbrio ( $P_{eq}$ ).

#### COMENTÁRIOS

Com base nos dados de 208 1/2 e 475 horas, a extrapolação para começar em gráfico semilogarítmico, indica uma atividade inicial (fluxo) de 3,2 g TG/h/g enzima com um grau correspondente de conversão  $x = 28\%$ . Uma estimativa da meia-vida é de 500 - 600 horas a 60°C, sem solvente e óleo oliva/P = 2 1/2:1 (p/p). Não se experimentaram problemas de queda de pressão. Uma tentativa anterior de passar um substrato similar através de lipase adsorvida em Celite do tipo descrito no pedido de patente DK Nº 563/77, em uma coluna, foi impossível.

#### EXEMPLO 13

Este exemplo ilustra uma produção em escala de planta piloto de uma preparação de lipase imobilizada em uma coluna e a aplicação desta preparação para interesterificação contínua em uma coluna com substrato a 60 e 70°C, sem solvente.

#### IMOBILIZAÇÃO

6,0 kg (81% matéria seca) de resina trocadora de ions Duolite ES 562, foram condiciona-

dos de acordo com a informação do fabricante (Duolite Technical Information O110A). Isto implica a ciclização do ácido base e, neste caso, também um enxague em etanol) (para assegurar máxima pureza no processamento de alimentos), o pH ajustado a 6,0 em tampão acetato 0,1 M. A suspensão foi enchida em uma coluna e a resina assentada (18 l) foi lavada com 72 l de água.

18 l de lipase *Mucor miehei* (10,100 LU/ml), ajustado a pH 6,0, foram recirculados a 30 l/h por 6 horas, com controle do pH. Após deslocamento com 20 l de água, um volume combinado de 37 l continham 126 LU/ml, correspondendo a um rendimento de 97% de imobilização. A coluna foi depois lavada com outros 20 l de água, e a preparação seca a vácuo em temperatura ambiente, assim se obteve 6,0 kg (97% de matéria seca) de preparação de lipase imobilizada. A atividade de interesterificação em batelada foi de 30,2% POO, 6,9% POP a 1/2 hora, ou 14,7%  $P_{inc}$ .

#### EXPERIMENTO DE APLICAÇÃO Nº 1

Colocou-se 4,0 g da preparação de lipase imobilizada em uma coluna com camisa de água com um diametro interno de 1,5 cm. Manteve-se a temperatura na coluna a 60°C. Um substrato de óleo de

oliva/ácido decanóico com uma composição de 2,5/1 (p/p) foi bombeada através de uma pré-coluna co - luna 30g de Duolite S 561, saturada com 21 ml de água trocadora de ions e depois através de coluna principal contendo a preparação de lipase imobilizada. Controlou-se a fluência a fim de manter a composição da saída a um valor correspondendo a aproximada 65% de conversão, isto é, 23% DOO no triglicerídeo final (DOO significa um triglicerídeo com uma unidade de ácido decanóico (em posição externa) e duas unidades de ácido oleico).

Considerando que a diminuição da atividade da lipase imobilizada segue uma reação de primeira ordem, pode-se estimar a meia-vida como de 3200 horas. Com uma atividade inicial de 2,4g triglicerídeo/hora/g, a preparação de enzima produtividade é aproximadamente 8,3 toneladas de triglicerídeo/kg de preparação de enzima, considerando um tempo decorrido de duas meia-vidas. Na figura 1, o logaritmo para a fluência é traçado em gráfico contra o tempo.

#### EXPERIMENTO DE APLICAÇÃO Nº 2

Realizou-se a mesma experiência que no nº 1, a 70°C em vez de 60°C.

Verificou-se ser a meia-vida de 1300 horas e a atividade inicial de 2,3 g triglicerídeo/



hora/g preparação de enzima, correspondendo a uma produtividade de 3,2 toneladas de triglicerídeo/kg preparação de enzima. O logaritmo para a fluência é traçado em gráfico contra tempo na figura 2.

#### 5 EXEMPLO 14

Este exemplo ilustra o potencial de uma preparação de lipase imobilizada produzida de acordo com a invenção, para a interesterificação contínua de uma mistura de triglicerídeo de elevado ponto de fusão, composta de sebo de bovinos e óleo de soja, sem solvente ou outros agentes auxiliares. Processos similares podem ser utilizáveis para a preparação de gorduras específicas sem o uso de hidrogenação e interesterificação química e apropriados para margarina ou produtos correlatos.

#### 15 IMOBILIZAÇÃO

19,8 gramas de resina trocadora de ions Duolite A 561 úmida (86,0% de matéria seca), com mais de 80% das partículas entre 400 e 850  $\mu\text{m}$ , foram ajustados a pH 6,0 em suspensão aquosa, e lavados com água. 50 ml de lipase Mucro miehei (7400 LU/ml) 8% de matéria seca) foram misturados com a resna e o pH reajustado a pH 6,0. Após agitação por 2 horas em temperatura ambiente, filtragem e lavagem com 2 x 50 ml de água, a preparação foi seca em vácuo, em temperatura ambiente. O rendi-

mento foi de 19,2 gramas, contendo 8,5% de água.

A atividade deixada no filtrado foi de 34% da quantidade inicial total. A atividade da interesterificação em batelada foi de 25,4% POO, 6,0% POO a 1/2 hora ou 12,5% P inc.

#### ANÁLISE DA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO

Sebo branco de bovinos e óleo de soja refinado, novo, foram adquiridos no comércio local. O substrato era composto de 1,5 partes de sebo e 1 parte de óleo de soja, que se misturou a 70 °C. Adicionou-se antioxidante BHT em uma concentração de 0,1%. Para caracterizar os componentes individuais e para seguir a reação de interesterificação, usou-se HPLC para analisar a composição de triglicerídeos dos componentes substratos, a mistura inicial e a mistura interesterificada. Uma reação em batelada inicial com 2,75 gramas de preparação de lipase *Mucor miehei* imobilizada, 24 gramas de sebo e 16 gramas de óleo de soja foi realizada por 16,5 horas a 65 °C. HPLC demonstrou que a relação de LPO- para LLL-triglicerídeo (L:linoléico, P: palmítico; O: oléico) na mistura aumentou de 0,62 para 1,16, estando, como se presume, esta última cifra próxima da relação de equilíbrio.

Propriedades de derretimento da mistura  
interesterificada

A variação das propriedades de derre-  
timento devido a interesterificação foi analisada  
5 por dilatação segundo o método oficial IUPAC [IUPAC  
- Métodos padronizados para a análise de óleo, gordu-  
ras e derivados, 6a. Edição, Método nº 2.141 (1979)].  
Os resultados aparecem da tabela abaixo, com uma  
mistura não interesterificada de sebo de boi e óleo  
10 de soja (1,5:1) como referência.

Temperatura, °C		0	20	25	30	35	40	45
15 Dilata- ção (µl /g de gordura)	mistura não interesteri- ficada ....	30,8	22,9	18,7	14,6	11,2	6,5	1,6
	mistura in- teresterifi- cada .....	16,5	4,9	4,9	3,1	0,6		

TESTE NA COLUNA

Operou-se um sistema em coluna peque-  
na com termostrato, por 2 dias, para ilustrar um pro-  
20 cesso contínuo. Colocou-se 4,0 gramas da preparação  
de lipase imobilizada descrita em uma coluna. Também  
se usou uma pre-coluna contendo 5 gramas de resina  
Duolite A 561 úmida (50% de matéria seca). Alimentou-  
5 -se continuamente sebo de bovino/óleo de soja, em  
relação de 1,5:1 p/p, através do sistema de coluna,

a 67°C. Apresenta-se o desempenho da preparação de lipase imobilizada na tabela abaixo:

Amostra/ tempo	Fluxo g TG/h/ g enz.	Composição LPO/LLL	Conversão, %
5 Substrato Sebo/SBO (18 h) .....	-	0,65	-6
Produto de 18 h	2,10	0,90	52
Produto de 41 h	1,63	0,93	54
Equil. (batelada)	-	1,16	100

10

#### EXEMPLO 15

Este exemplo ilustra a aplicação de lipase imobilizada de acordo com a invenção para hidrólise de gordura.

15

A uma mistura 1:1 de sebo de boi puro e água, 40 gramas de cada, foi adicionada lipase imobilizada, preparada conforme descrito no exemplo 13, em uma quantidade que corresponde a 100 LU/g de gordura ou 0,23 gramas de preparação de lipase imobilizada, admitindo uma carga de 30.000 LU/g de lipase imobilizada. Foi obtida uma misturação efetiva por agitação magnética a 48°C. O valor inicial do pH na fase aquosa foi ajustado a 8,0. Depois de 4 dias, a enzima foi separada e a fase de gordura analisada quanto ao grau de hidrólise (GH). Foram realizados testes em duplicata. A enzima

20

25

31

imobilizada recuperada foi usada para um ensaio de 2 minutos e foi realizada uma experiência comparativa com lipase solúvel, também adicionada numa quantidade correspondente a 100 LU/g de gordura, Neste caso, a fase aquosa foi usada para o ensaio de 2 minutos. Foram conduzidos três testes com lipase solúvel.

Os resultados foram os seguintes:

Preparação	Amostra nº	% AH, 4 dias, 48°C	
		Ensaio, 1 min	Ensaio, 2 min.
Lipase imobilizada ....	1	30	31
	2	35	37
Lipase solúvel	1	61	5
	2	55	8
	3	46	7

O valor do pH caiu a cerca de 6,8 com a lipase imobilizada e a cerca de 6,3 no ensaio de 1 min. e a cerca de 7,4 no ensaio de 2 min., com a lipase solúvel. %AH foi calculada como o valor de ácido (VA) dividido pelo valor de saponificação(VS).

Revisão N.º 05/1/69

2 - R. 11/1/69

21.01. C12 N 11, 08

Substituir,  
na 3ª via B.

1

### REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção de uma preparação de lipase imobilizada, destinada à interesterificação de gorduras, caracterizado em que uma solução aquosa de uma lipase termoestável, derivada preferencialmente de uma espécie *Mucor termofílica*, é contactada com uma resina trocadora de ânions, fraca, macroporosa, em partículas, que contém grupos amino primários e/ou secundários e/ou terciários, e que demonstra um tamanho de partícula médio na faixa de 100 a 1000 microns, apropriado para operação em coluna sem excessiva queda de pressão sob condições em que a lipase é ligada à resina trocadora de ânions durante um período de tempo de 0,5 a 8 horas, suficiente para ligar a quantidade desejada de lipase à resina trocadora de ânions, depois do que a lipase imobilizada, assim formada, é separada da fase aquosa e a lipase imobilizada separada é seca a um teor em água de entre aproximadamente 2 e 40%.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a lipase microbiana é derivada da espécie termofílica, *Mucor miehei*.

3. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que mais de 90% das

partículas da resina trocadora de ânions, fraca, macroporosa, tem um tamanho de partículas entre 100 e 1000  $\mu\text{m}$ , de preferência, entre aproximadamente 200 e 400  $\mu\text{m}$ .

4. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a proporção entre a quantidade da solução aquosa da lipase microbiana termoestável e o peso da resina trocadora de ânions fraca corresponde a 5000 - 50000 LU/g de resina trocadora de íons (peso a seco).

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pH durante o contato entre a resina trocadora de íons e a solução aquosa está entre 5 e 7.

6. Processo de acordo com qualquer reivindicação 1 ou 5, caracterizado pelo fato de que a separação é realizada por simples filtração, com lavagem com água da massa separada para remover a lipase não ligada.

7. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a secagem é realizada até a massa separada ter um teor em água entre 5 e 20%.

8. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 7, caracterizado pelo fato de que a resina trocadora de ânions, fraca, macroporosa, em partículas, é reunida com uma solução aquosa de um agente reticulante, de preferência uma solução aquosa de glutaraldeído, a uma concentração entre 0,1 e 1,0% p/p, antes, durante ou após o contato

entre a resina trocadora de ânions, fraca, macroporosa, em partículas, e a solução aquosa de lipase microbiana, termoestável, e, a seguir, a solução restante de agente de reticulação é separada.

RD

SMP

011



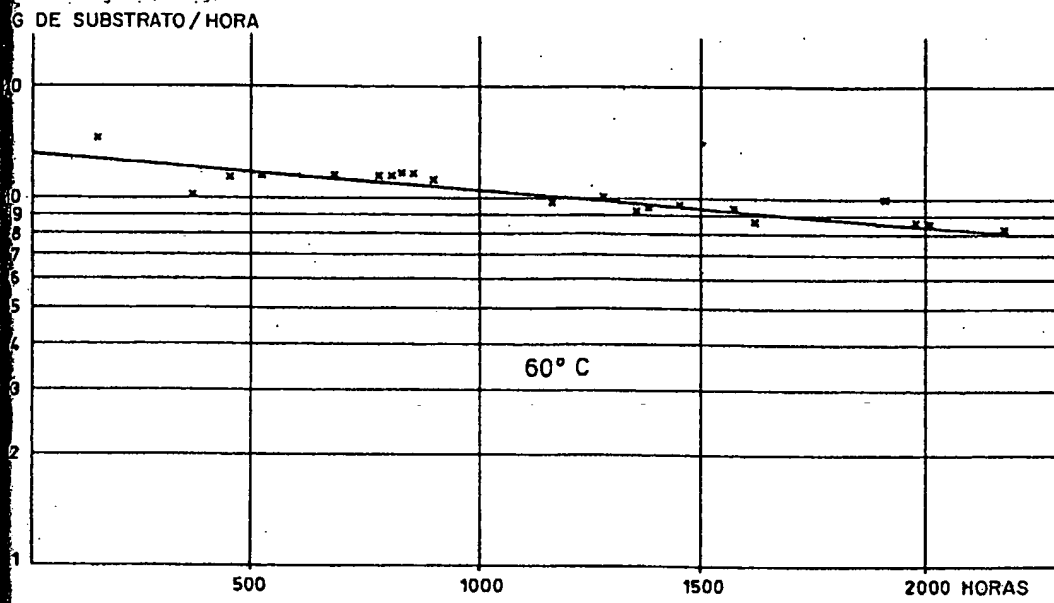


fig.1

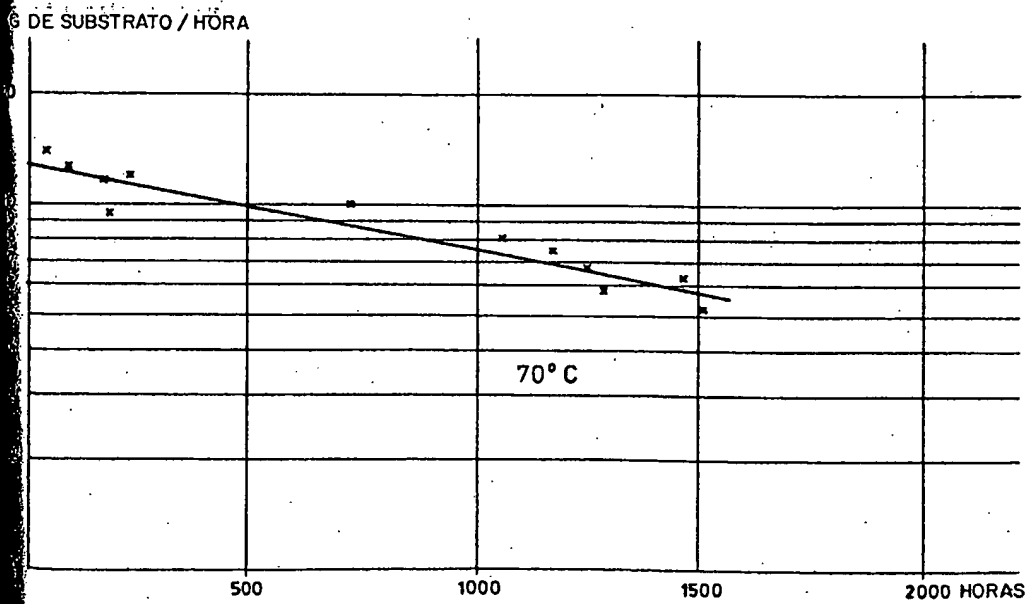


fig.2

35651

35651

1

R E S U M O

Patente de Invenção "PROCESSO PARA  
A PRODUÇÃO DE UMA PREPARAÇÃO DE LIPASE IMOBILIZADA,  
DESTINADA À INTERESTERIFICAÇÃO DE GORDURAS".

5                    Processo para a produção de uma pre-  
paração de lipase imobilizada compreende o contato  
de uma solução aquosa de uma lipase microbiana com  
uma resina trocadora de anions fraca, em condições  
específicas, com relação ao pH e tempo de contato,  
10 e depois a preparação é isolada e secada. A pre-  
paração pode ser usada para transesterificação con-  
tínua de gorduras sem solventes ou outros agentes  
auxiliares onerosos.

SAR

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**